

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 2002-027969

(43)Date of publication of application : 29.01.2002

(51)Int.Cl.

C12M 1/00

C12N 15/09

(21)Application number : 2000-212366

(71)Applicant : NATIONAL FOOD RESEARCH
INSTITUTE
KIKUCHI YUJI

(22)Date of filing : 13.07.2000

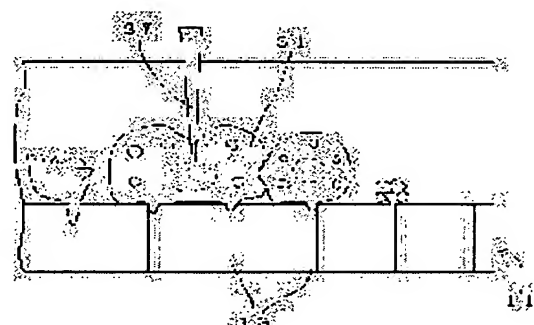
(72)Inventor : KIKUCHI YUJI

(54) MICROCHANNEL ARRAY DEVICE, METHOD FOR HOLDING PARTICLE, METHOD FOR HOLDING CELL AND INJECTING SUBSTANCE, AND APPARATUS FOR HOLDING CELL AND INJECTING SUBSTANCE

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To provide both a method by which various kinds of problems in practical use of a microinjection method are solved, trapping of a particle, sticking of a needle, or the like, are readily carried out while observing a cell under a microscope and a substance can efficiently be injected into the particle (e.g. the cell) and a device suitable for carrying out the method.

SOLUTION: The cell is sucked and trapped into an opened end by using a microchannel array device having the opened end for trapping the particle in an end face (lateral face) of a substrate in place of a conventional method for trapping the cell on the surface of the substrate. Thereby, a micropipet 27 can be moved in the direction of microscopic observation and in the focal depth thereof. As a result, the substance can practically efficiently be injected.



LEGAL STATUS

[Date of request for examination] 13.07.2000

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number] 3602775

[Date of registration] 01.10.2004

* NOTICES *

JPO and NCIPi are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

1. This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
2. **** shows the word which can not be translated.
3. In the drawings, any words are not translated.

CLAIMS

[Claim(s)]

[Claim 1] By consisting of the 1st substrate which has the hollow which has the through tube which penetrates a substrate, this hollow, and the detailed slot of a large number which open between the end faces of a substrate for free passage on this substrate front face, and the 2nd transparent substrate, and joining said 2nd substrate to the front face of said 1st substrate Micro-channel array equipment characterized by forming the opening edge for particle traps which is the joint of said 1st substrate and said 2nd substrate, and is formed in the end face of said 1st substrate of said slot.

[Claim 2] Micro-channel array equipment according to claim 1 whose 1st substrate is a silicon substrate and whose 2nd substrate is a transparent glass substrate.

[Claim 3] The particle maintenance approach characterized by carrying out the suction trap of the particle to the opening edge for particle traps to which **** is applied through the through tube of the 1st substrate, and which is formed in the 1st set plate edge side of it using micro-channel array equipment according to claim 1 or 2.

[Claim 4] The particle maintenance approach according to claim 3 that the particle by which a suction trap is carried out is a cell.

[Claim 5] The particle maintenance approach according to claim 4 characterized by carrying out the suction trap of the particle while carrying out microscope observation of near the opening edge for particle traps currently formed in the 1st set plate edge side using both transmitted illumination and incident light mold reflected illumination.

[Claim 6] The cell maintenance and the matter injector which are characterized by consisting of ***** for extruding the matter, and a **** generator for suction traps from the micromanipulator which operates the microscope and micropipette which have both micro-channel array equipment according to claim 1 or 2, said stage for micro-channel array equipment loading, transmitted illumination, and incident light mold both [either or], and said micropipette, and said micropipette.

[Claim 7] The cell maintenance and the matter impregnation approach which are characterized by pouring the matter into intracellular by stabbing a micropipette to the cell by which **** was applied through the through tube of the 1st substrate, carried out the suction trap of the cell to the opening edge for particle traps currently formed in the 1st set plate edge side of it using cell maintenance according to claim 6 and a matter injector, and the suction trap was subsequently carried out.

[Claim 8] The cell maintenance according to claim 7 and the matter impregnation approach of pouring the matter into intracellular by stabbing a micropipette to the cell by which carried out the suction trap of the cell and the suction trap was subsequently carried out, carrying out microscope observation of near the opening edge for particle traps currently formed in the 1st set plate edge side using both transmitted illumination and incident light mold reflected illumination.

[Translation done.]

* NOTICES *

JPO and NCIPi are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

1. This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
2. **** shows the word which can not be translated.
3. In the drawings, any words are not translated.

DETAILED DESCRIPTION

[Detailed Description of the Invention]

[0001]

[Field of the Invention] This invention relates to the micro-channel array equipment for attaining the increase in efficiency of the most suitable microinjection method to inject matter, such as a gene, into a cell in detail about micro-channel array equipment, the particle maintenance approach, cell maintenance, the matter impregnation approach, cell maintenance, and a matter injector, the particle maintenance approach, cell maintenance, the matter impregnation approach, cell maintenance, and a matter injector.

[0002]

[Description of the Prior Art] Development of the new technique which can introduce a gene into intracellular serves as a key, when raising the breeding effectiveness of the animals-and-plants kind which has a useful special feature, and a microorganism kind. Although the approach of former versatility has been developed, the technique of having both certainty and efficiency is underdeveloped.

[0003] For example, although the microinjection method which operates the glass micropipette for cell maintenance and the glass micropipette for a cell stab using a micromanipulator, and injects a gene into one one-piece cell is most positive approach, the actuation takes skill and time amount, therefore it has become a big fault that a throughput is low. However, when processing a precious cell and a precious gene, since certainty is thought more as important, a microinjection method is alternative only even in current.

[0004] Then, ED efforts of the former many have been performed about the increase in efficiency of this microinjection method. For example, a through tube is regularly opened in a substrate, the trap of the cell is carried out there, and the attempt which automates impregnation by controlling the location of a substrate and the location of an impregnation needle by the step motor and the computer automatically is indicated by JP,1-112976,A. this invention person also advanced increase in efficiency further by developing the technique which produces the micro capillary tube array which arranged many impregnation needles regularly, and enabling package impregnation of DNA to all the cells held at the micro chamber array using the micro chamber array which has a chamber in the location corresponding to this (JP,2000-23657,A).

[0005] However, any above-mentioned invention performs equipment development, assuming the configuration of a cell, magnitude, and resiliency to be almost uniform. It is very rare that they are almost fixed in fact, and, as for the configuration of a cell, magnitude, and resiliency, in almost all cases, it is common respectively that it is alike and there is big variation. Therefore, in having performed identically location actuation of an impregnation needle to each cell, it results in a needle not being stuck to many cells or destroying many cells. Therefore, in almost all cases, stabbing a needle is called for, observing from the point of certainty under a microscope to one-piece one cell by which the trap was carried out.

[0006] Thus, since stabbing a needle is called for observing from the point of certainty under a microscope at present to one-piece one cell by which the trap was carried out, the technique which increases more the efficiency of the trap of a cell while observing under a microscope, or the stab of a needle etc. is demanded.

[0007] by the way, the above -- each microinjection equipment developed until now opens a through tube in a substrate front face regularly, is performing holding a cell at the opening edge, and it is constituted so that a cell may be held on the surface of a substrate. [including any invention]

[0008] However, opening a minute through tube in transparence substrates, such as a glass substrate, cannot but use a silicon substrate from a very difficult thing as a substrate which opens a minute through

tube in fact. A silicon substrate must stop in that case, having to observe a cell by the incident light mold reflected illumination method in order not to penetrate the light. And in the through tube section, light is not reflected, or scattered reflection is carried out, the part in right above [of it] serves as an umbra, and observation becomes difficult. Furthermore, since the direction and the microscope observation direction which a needle moves are almost the same, it is very difficult to actually perform microscope observation, and especially observation for the high scale factor to which activity distance becomes short is impossible in practice. Moreover, even if it can carry out microscope observation, in order that a needle may run by the direction of the depth of focus of a microscope, an image fades with a motion and the location actuation becomes very difficult.

[0009] Therefore, it is almost impossible to perform a needle stab while observing a cell under the microscope currently called for from the point of certainty with the old microinjection equipment constituted so that a cell may be held on the surface of a substrate.

[0010] Since there was a trouble of above many, in the above-mentioned microinjection method, the present condition of the technique which increases more the efficiency of the trap of a cell or the stab of a needle etc. while observing under a microscope is that the utilization is not progressing.

[0011]

[Problem(s) to be Solved by the Invention] It aims at offer of the method of pouring the matter into a particle (for example, cell) efficiently [the trap of a particle while solving the various problems in actual use of a microinjection method and observing a cell under a microscope, the stab of a needle, etc. are easy for this invention, and], and the suitable equipment for operation of this approach.

[0012]

[Means for Solving the Problem] this invention person is in charge of operation of a microinjection method, as a result of repeating examination wholeheartedly that the above-mentioned technical problem should be solved. How to open many through tubes in a substrate front face, and carry out the trap of the cell to the opening edge, Namely, by changing to the old approach of carrying out the trap of the cell on the surface of a substrate, and carrying out the inhalation trap of the cell to this opening edge using the micro-channel array equipment which has an opening edge for particle traps in the end face (side face) of a substrate Migration of the micropipette tip within the direction and the depth of focus of microscope observation is enabled, and it came to complete this invention for the ability of the matter to be poured in well thereby in practice based on a header and this knowledge.

[0013] this invention person devises the approach of creating a micro-channel array by covering the array of the detailed slot processed into the silicon substrate until now with a glass substrate. Although the application (JP,2-130471,A, the patent No. 2532707 official report) to the constituent-of-blood measurement, filtration of a particle, the application (JP,11-165062,A) to a classification, etc. have been developed this invention person invents the micro-channel array equipment which holds a particle to the 1st set plate edge side using the micro-channel opening edge of use to the microinjection method of a micro-channel array, and the adhesion section of the 1st substrate and the 2nd substrate for the first time this time.

[0014] Namely, the hollow which has the through tube to which this invention concerning claim 1 penetrates a substrate, By consisting of the 1st substrate which has this hollow and the detailed slot of a large number which open between the end faces of a substrate for free passage on this substrate front face, and the 2nd transparent substrate, and joining said 2nd substrate to the front face of said 1st substrate The micro-channel array equipment characterized by forming the opening edge for particle traps which is the joint of said 1st substrate and said 2nd substrate, and is formed in the end face of said 1st substrate of said slot is offered.

[0015] The 1st substrate is a silicon substrate and this invention concerning claim 2 offers the micro-channel array equipment according to claim 1 whose 2nd substrate is a transparent glass substrate.

[0016] Using micro-channel array equipment according to claim 1 or 2, this invention concerning claim 3 applies **** through the through tube of the 1st substrate, and offers the particle maintenance approach characterized by carrying out the suction trap of the particle to the opening edge for particle traps currently formed in the 1st set plate edge side of it.

[0017] This invention concerning claim 4 offers the particle maintenance approach according to claim 3

that the particle by which a suction trap is carried out is a cell.

[0018] This invention concerning claim 5 offers the particle maintenance approach according to claim 4 characterized by carrying out the suction trap of the particle, carrying out microscope observation of near the opening edge for particle traps currently formed in the 1st set plate edge side using both transmitted illumination and incident light mold reflected illumination.

[0019] This invention concerning claim 6 offers the cell maintenance and the matter injector which are characterized by consisting of ***** for extruding the matter, and a **** generator for suction traps from the micromanipulator which operates the microscope and micropipette which have both micro-channel array equipment according to claim 1 or 2, said stage for micro-channel array equipment loading, transmitted illumination, and incident light mold both [either or], and said micropipette, and said micropipette.

[0020] Cell maintenance according to claim 6 and a matter injector are used for this invention concerning claim 7. By stabbing a micropipette to the cell by which **** was applied through the through tube of the 1st substrate, carried out the suction trap of the cell to the opening edge for particle traps currently formed in the 1st set plate edge side of it, and the suction trap was subsequently carried out The cell maintenance and the matter impregnation approach which are characterized by pouring the matter into intracellular are offered.

[0021] This invention concerning claim 8 offers the cell maintenance according to claim 7 and the matter impregnation approach of pouring the matter into intracellular by stabbing a micropipette to the cell by which carried out the suction trap of the cell and the suction trap was subsequently carried out, carrying out microscope observation of near the opening edge for particle traps currently formed in the 1st set plate edge side using both transmitted illumination and incident light mold reflected illumination.

[0022]

[Embodiment of the Invention] Below, the gestalt of operation of this invention is shown. The hollow which has the hole with which this invention which relates to claim 1 first penetrates a substrate about micro-channel array equipment, By consisting of the 1st substrate which has this hollow and the detailed slot of a large number which open between the end faces of a substrate for free passage on this substrate front face, and the 2nd transparent substrate, and joining said 2nd substrate to the front face of said 1st substrate It is characterized by forming the opening edge for particle traps which is the joint of said 1st substrate and said 2nd substrate, and is formed in the end face of said 1st substrate of said slot. The micro-channel array equipment of this invention concerning such a claim 1 is explained referring to a drawing. Drawing 1 is the front view showing one example of the 1st substrate 11, and one example of the design of the hollow and slot which exist on the 1st substrate 11 is shown. Drawing 2 is the explanatory view to which the A section of drawing 1 was expanded. Drawing 3 is drawing which expanded a part of side face of the micro-channel array equipment of this invention concerning claim 1 which consists of the 1st substrate 11 and the 2nd transparent substrate 15, and is the explanatory view showing the condition of carrying out the trap of the cell.

[0023] The micro-channel array equipment of this invention concerning claim 1 is obtained by joining and sticking the 1st substrate 11 and the 2nd substrate 15 as shown below. A flat-surface configuration is the sheet metal-like thing which makes the shape of an abbreviation rectangle, and the 1st substrate 11 consists of a silicon substrate, as indicated especially to claim 2. The hollow 12 which has the hole 14 which penetrates this substrate, this hollow 12, and the detailed slot 13 of a large number which open between the end faces of a substrate for free passage are established in the front face of this 1st substrate 11. each of the short segment of a large number which connect the edge of the 1st substrate 11 which is parallel to the edge of a hollow 12 among drawing 1 and drawing 2 at it -- the fang furrow 13 is shown. It is good also as what makes the shape of an abbreviation rectangle which is not limited to this by becoming depressed here although the flat-surface configuration of 12 is made into the shape of an abbreviation "E" character by drawing 1 , and covers the whole abbreviation for the 1st substrate 11. Moreover, in drawing 2 and drawing 3 , although the taper (inclination) should be attached to the 1st substrate 11 shown in drawing 1 by the periphery section, even if this taper does not exist, it does not interfere.

[0024] In the 1st substrate 11, the through tube 14 which penetrates the front rear face of a substrate further becomes depressed, and it is prepared in 12. In drawing 1 , although what has a circular flat-surface

configuration is shown as a through tube 14, if it is not limited to this and **** can be applied through this through tube 14, even if a flat-surface configuration is the thing of a square shape etc., it will not interfere. Moreover, at drawing 1, although the through tube 14 is formed in the center section of the 1st substrate 11, it cannot be overemphasized that it is not what shows one example and is limited to this.

[0025] Furthermore, the detailed slot 13 of a large number which open between a hollow 12 and the end faces of a substrate for free passage is established in the 1st substrate 11. That is, as shown in the 1st substrate 11 at drawing 1 and drawing 2, many (meeting an up-and-down end face in drawing 1) detailed (it ties) slots 13 which open for free passage between the end faces of the 1st substrate 11 which is parallel to the edge of a hollow 12 at it are established in the substrate front face around a hollow 12 along with the end face of a substrate. Thus, many detailed slots 13 open for free passage between the end faces of the substrate which is parallel to the edge of a hollow 12 at it.

[0026] Such 1st substrate 11 can be obtained using the technique of photolithography and etching by processing as follows a wafer (sheet metal for substrates which consists of a silicon single crystal). First, by the 1st photolithography and etching, a slot 13 is processed, next, it becomes depressed by the 2nd photolithography and etching, and 12 is processed. Furthermore, the 1st substrate (chip) 11 is producible by processing a through tube 14 by the sandblasting method etc., and finally cutting a wafer.

[0027] It is desirable to use the anisotropic etching by the high density plasma for it, since an end face is finely finished in the cut of a wafer. The anisotropic etching according to the high density plasma here is a technique which forms a cut part in the photoresist applied to the substrate front face, and is cut into it by etching by the high density plasma of reactant ion by using the photoresist as a mask according to a photolithography process. In addition, the end face which is equal to practical use can be obtained by it being careful also of a dicing cut for the chip of an edge to become the minimum, and performing it. Moreover, it may carve by etching by a certain Mr. Fukashi, and the dicing cut of the remainder may be carried out.

[0028] Although especially the magnitude of such 1st substrate 11 is not limited, from being used for the trap of a particle, especially a cell, it is 8-12mm long, 16-24mm wide, and a thing with a thickness of about 0.4-0.6mm, and the width of face of a slot 13 is 0.002-0.02mm, and die length is usually about 0.05-0.2mm.

[0029] Next, the 1st substrate 11 of the above and the 2nd substrate 15 joined and stuck are transparent substrates, and as indicated to claim 2, it usually consists of a transparent glass substrate. Therefore, as indicated to claim 2, as for the 1st substrate and the 2nd substrate, it is desirable that it is with the silicon substrate which consists of a silicon single crystal, respectively, and the transparent glass substrate which consists of transparent glass. If this 2nd substrate 15 usually has the same flat-surface configuration as the 1st substrate 11 of the above, and abbreviation and makes it larger than the 1st substrate 11, as shown in drawing 3, it can hold a particle (cell) 16 certainly in the corner section formed on the end face of the 1st substrate 11, and the front face of the 2nd substrate 15. As long as it is larger than the 1st substrate 11, of course, the 2nd substrate 15 may be a disk configuration.

[0030] The micro-channel array equipment of this invention concerning claim 1 joins the 2nd substrate 15 of the above to the front face of the 1st substrate 11 of the above, i.e., the side in which the hollow 12, the slot 13, etc. are established, and stuck to it. So to speak, the opening edge B for particle traps which is the joint of the 1st substrate 11 and the 2nd substrate 15, and is formed in the end face of the 1st substrate 11 of a slot 13 is automatically formed by joining and sticking the 2nd substrate 15 of the above on the front face of the 1st substrate 11 of the above. The trap (prehension) of the particle (cell) 16 is carried out to this opening edge B for particle traps.

[0031] If the 2nd substrate 15 with a larger flat-surface configuration than the 1st substrate 11 is used as described above, as shown in drawing 3, the corner section is formed near [for particle traps] opening edge B on the end face of the 1st substrate 11, and the front face of the 2nd substrate 15, and a particle (cell) 16 can be certainly held in this corner section.

[0032] As an approach of joining the 2nd substrate 15 of the above to the front face of the 1st substrate 11, and sticking on it, although an anode plate conjugation method can also be used, for example, preferably since [if needed] it is dismountable, it is good to make both stick by pressure mechanically using an electrode holder etc.

[0033] The condition of using an electrode holder, having joined and having made drawing 4 and drawing 5 sticking the 2nd substrate 15 of the above to the front face of the 1st substrate 11 mechanically is shown. Drawing 4 is the front view and drawing 5 is the top view. This drawing 4 and drawing 5 are the examples using a disc-like glass substrate as the 2nd substrate 15. Among drawing, the sign 17 shows the electrode holder and consists of the push screw 18, resin block 19, O ring 20, an installation base 21, etc. By pushing the resin block 19 with the push screw 18 of such an electrode holder 17, the 1st substrate 11 is pushed and stuck [join and] to the 2nd substrate 15 through O ring 20. Usually, substrate 15a for a pin center, large guide is carried on the 2nd substrate 15, and the circular hole of magnitude with which the 1st substrate 11 enters in the center of this substrate 15a for a pin center, large guide exactly is opened. By doing so, the 1st substrate 11 can be easily placed in the center of the 2nd substrate 15. This substrate 15a for a pin center, large guide is good at a plastic plate. In this case, while carrying out optical polish of the original front face (part which are parts other than slot 13 and hollow 12, and is stuck with the 2nd substrate 15) of the 1st substrate 11, by using that by which optical polish was carried out, the front face of the 2nd substrate 15 can also make both degree of adhesion high enough, and can prevent leakage.

[0034] Generally, when preparing a cell sample, it is common that some cells break and the fragment etc. is intermingled. Moreover, the inclusion cannot be removed in many cases. Therefore, also when carrying out the suction trap of the particle (cell) 16 to the opening B of 1st substrate 11 end face, a result with which some slots 13 which inclusion may be attracted and often constitute the micro channel are got blocked is brought. When the 1st substrate 11 and the 2nd substrate 15 are made to stick by pressure mechanically as shown in drawing 4 and drawing 5 like the above, by removing and washing these substrates after use and making both stick by pressure again, plugging can be removed easily, therefore a reuse becomes possible. On the other hand, when it is made to paste up by joining, it is difficult to remove plugging and a reuse becomes difficult.

[0035] By joining and sticking the 2nd substrate 15 on the front face of the 1st substrate 11 in this way, the opening edge B for particle traps which is the joint of the 1st substrate 11 and the 2nd substrate 15, and is formed in the end face of the 1st substrate 11 of a slot 13 is formed, and the micro-channel array equipment of this invention concerning claim 1 carries out the trap (prehension) of the particles (cell etc.) 16 to this opening edge B for particle traps. Since the end face 22 of the 1st substrate 11 with which the opening edge B for particle traps is formed has structure which can be accessed freely from the outside and there is no obstruction in the upper part as shown in drawing 5, the microscope observation by transmitted illumination is possible.

[0036] This invention concerning claim 3 offers the particle maintenance approach using the micro-channel array equipment of this invention concerning such claim 1 or 2. It is characterized by this invention concerning claim 3 carrying out the suction trap of the particle to the opening edge for particle traps to which **** is applied through the through tube of the 1st substrate and which is formed in the 1st set plate edge side of it about the particle maintenance approach using micro-channel array equipment according to claim 1 or 2. In addition, although drawing 6 mentioned later is the explanatory view showing a pattern that cell maintenance and matter impregnation are performed, using one example of cell maintenance of this invention concerning claim 6, and a matter injector, since it is used also by the approach of this invention concerning this claim 3, suppose suitably that the equipment by the place which carries out the suction trap of the particle 16 is explained with reference to this.

[0037] In this invention concerning claim 3, micro-channel array equipment according to claim 1 or 2 is used. It is as having described above about this. In this invention concerning claim 3, using such micro-channel array equipment according to claim 1 or 2, **** is applied through the through tube 14 of the 1st substrate 11, and the suction trap of the particle 16 is carried out to the opening edge B for particle traps currently formed in 1st substrate 11 end face of it.

[0038] For example, first, it is near [for particle traps] opening edge B, and near the corner section formed on the end face of the 1st substrate 11, and the front face of the 2nd substrate 15, particles (cell etc.) 16 are placed and the preparations which carry out the suction trap of the particle 16 to the opening edge B for particle traps are made. In addition, although especially a means to place a particle 16 near the corner section is not limited, it prepares independently a micromanipulator for the diameter of a tip to operate a large micropipette and large it, puts in particle suspension beforehand in the micropipette, brings a

micropipette tip location near the corner section with a micromanipulator, and should just extrude particle suspension from a micropipette. What is necessary is just to operate pushing a particle for the micropipette 27 for a particle (cell) stab as shown in this invention concerning claim 6 at the micropipette tip using a micromanipulator 28 etc., in order to bring a particle close to the opening edge B for particle traps further. However, since a particle will move and it will come to an opening edge with a surrounding liquid if it draws in, generally the actuation is unnecessary. The hole which has been opened in the center of substrate 15a for a pin center, large guide is set to liquid pool 15b in that case. Next, **** is applied using the **** generator 30 for suction traps made to generate **** for carrying out the suction trap of the particles 16, such as a cell installed separately, through the through tube 14 prepared in the 1st substrate 11. Then, via the hollow 12 established in the 1st substrate 11, **** starts the opening edge B for particle traps, near [said] the corner section, the suction trap of the particle 16 is carried out to the opening edge B for particle traps, and it is held as it is.

[0039] In addition, as a particle set as the object of a suction trap, as indicated, for example to claim 4, the cell which serves as an object into which matter, such as DNA, is poured in a microinjection method is mentioned.

[0040] As indicated to claim 5, here near the opening edge B for particle traps currently formed in the end face of the 1st substrate 11, carrying out microscope observation using both transmitted illumination and incident light mold reflected illumination If the suction trap of the particle 16 is carried out, the micro-channel [which uses incident light mold reflected illumination for coincidence] array side by which the microscope observation by transmitted illumination is attained to a particle 16, and the hollow 12 and the slot 13 are formed in it can also carry out microscope observation at coincidence. Therefore, the particles 16, such as a cell, can be held more certainly.

[0041] Next, this invention concerning claim 6 is characterized by consisting of ***** for extruding the matter, and a **** generator for suction traps about cell maintenance and a matter injector from the micromanipulator which operates the microscope and micropipette which have both micro-channel array equipment according to claim 1 or 2, said stage for micro-channel array equipment loading, transmitted illumination, and incident light mold both [either or], and said micropipette, and said micropipette.

[0042] Drawing 6 is the explanatory view showing a pattern that cell maintenance and matter impregnation are performed, using one example of cell maintenance of this invention concerning claim 6, and a matter injector. The cell maintenance and the matter injector of this invention concerning claim 6 have micro-channel array equipment according to claim 1 or 2. The hollow 12 which has the through tube 14 which penetrates a substrate as such micro-channel array equipment was described above, The 1st substrate which has this hollow 12 and the detailed slot 13 of a large number which open between the end faces of a substrate for free passage on this substrate front face, By consisting of the 2nd transparent substrate 15 joined to the front face of this 1st substrate, and joining said 2nd substrate 15 to the front face of said 1st substrate 11 The opening edge B for particle traps which is the joint of the 1st substrate 11 and the 2nd substrate 15, and is formed in the end face of the 1st substrate 11 of a slot 13 is formed. The trap (prehension) of the particle (cell) 16 is carried out to this opening edge B for particle traps.

[0043] The cell maintenance and the matter injector of this invention concerning claim 6 first have said stage 23 for micro-channel array equipment loading other than micro-channel array equipment according to claim 1 or 2. It is not restricted especially that what is necessary is just what may carry micro-channel array equipment as this stage 23 for micro-channel array equipment loading.

[0044] The cell maintenance and the matter injector of this invention concerning claim 6 have the microscope 24 which has both transmitted illumination, and incident light mold both [either or] next.

Among drawing 6 , the sign 25 shows the light source for transmitted illumination, and the sign 26 shows the light source for incident light mold lighting. A known thing can be used for these.

[0045] The cell maintenance and the matter injector of this invention concerning claim 6 have ***** 29 for extruding the matter, and the **** generator 30 for suction traps from the micromanipulator 28 which operates the micropipette 27 further for a particle (cell) stab, and said micropipette, and said micropipette 27. A known thing can be used also about these. Furthermore, it is more desirable to stick the 1st substrate 11 and the 2nd substrate 15 mechanically using the electrode holder 17 as shown in drawing 4 and drawing 5 .

[0046] According to the cell maintenance and the matter injector of this invention concerning such a claim 6, the trap of a particle while observing a cell under a microscope, the stab of a needle, etc. can pour the matter into a particle (for example, cell) efficiently [it is easy and]. This invention concerning claim 7 and claim 8 offers the cell maintenance with such sufficient effectiveness and the matter impregnation approach using the cell maintenance and the matter injector of this invention concerning claim 6.

[0047] Namely, this invention concerning claim 7 relates to cell maintenance and the matter impregnation approach. **** is applied through the through tube of the 1st substrate using cell maintenance according to claim 6 and a matter injector. It is characterized by pouring the matter into intracellular by stabbing a micropipette to the cell in which carried out the suction trap of the cell to the opening edge for particle traps currently formed in the 1st set plate edge side, and the suction trap was subsequently carried out by it.

[0048] In this invention concerning claim 7, it is the same as that of this invention concerning claims 3 and 4 till the place which carries out the suction trap of the cell to the opening edge for particle traps. That is, first, it is near [for particle traps] opening edge B, and near the corner section formed on the end face of the 1st substrate 11, and the front face of the 2nd substrate 15, the particles 16, such as a cell, are placed and the preparations which carry out the suction trap of the particles 16, such as a cell, to the opening edge B for particle traps are made. In addition, this actuation is enough if particle suspension, such as a cell, is poured out near the corner section. Next, **** is applied from the **** generator 30 for suction traps through the through tube 14 prepared in the 1st substrate 11. Then, via the hollow 12 established in the 1st substrate 11, **** starts the opening edge B for particle traps, near [said] the corner section, the suction trap of the particles 16, such as a cell, is carried out to the opening edge B for particle traps, and they are held as they are.

[0049] Thus, the matter is poured into intracellular by stabbing the micropipette 27 for a particle (cell) stab to the particles 16, such as a cell by which the suction trap was carried out.

[0050] In pouring the matter into intracellular, the microscope observation by transmitted illumination is attained to the particles 16, such as a cell, by using the light source 25 for transmitted illumination etc. For this reason, it is possible to stab matter, such as DNA, easily by the micropipette 27 for a particle (cell) stab, observing near the opening edge B for particle traps currently formed in the end face of the 1st substrate 11 of transmitted illumination under a microscope 24.

[0051] Furthermore, as indicated to claim 8, while microscope observation using both transmitted illumination and incident light mold reflected illumination can be performed by using the light source 26 for incident light mold reflected illumination with the light source 25 for transmitted illumination and the microscope observation by transmitted illumination is attained to the particles 16, such as a cell, the micro-channel array side in which the hollow 12 and the slot 13 are formed can also carry out microscope observation using incident light mold reflected illumination. Therefore, it is possible to stab matter, such as DNA, certainty and more easily.

[0052] In addition, although the micropipette 27 for a particle (cell) stab is drawn with the inclination of about 45 degrees to the 2nd substrate 15 in drawing 6 Since a trap is carried out to the opening edge B for particle traps at which particles, such as a cell, are the joints of the 1st substrate 11 and the 2nd substrate 15, and were formed in the end face of the 1st substrate 11 not in the thing limited to this but in this invention, actuation in the condition of having brought to the horizontally near include angle is also possible. By doing in this way, the direction (horizontal) and the observation direction (perpendicular direction) of a microscope 24 from which the micropipette 27 for a particle (cell) stab is moved will intersect perpendicularly mostly. Therefore, it can observe for a high scale factor, and the tip of the micropipette 27 for a particle (cell) stab can be mostly moved within the depth of focus of a microscope 24, and location actuation can be performed more easily.

[0053] In addition, the suction trap of poplar PURASUTO is carried out using the cell maintenance and the matter injector of this invention concerning above-mentioned **** claim 6, and the reference drawing from the microscope image stabbed with the micropipette for a cell stab (needle) is shown in drawing 7 . The magnitude of poplar PURASUTO 31, a configuration, resiliency, etc. are very uneven, and a protoplast suspension preparation sample also contains impurities, such as a film fragment and a chloroplast. When performing a microinjection for such an irregular particle, this invention which can perform impregnation actuation efficiently is indispensable, observing under a microscope.

[0054]

[Effect of the Invention] Since this invention is constituted as explained above, it has effectiveness which is indicated below.

(1) The micro-channel array equipment of this invention concerning claims 1 and 2 In order to carry out the suction trap of the particles, such as a cell, to the opening edge for particle traps which does not hold a cell on the surface of a substrate like before, but is formed in the 1st set plate edge side, Since the end face 22 of the 1st substrate 11 with which the opening edge B for particle traps is formed has structure which can be accessed freely from the outside and there is moreover no obstruction in the upper part, the microscope observation by transmitted illumination is possible. According to the particle maintenance approach of this invention concerning claims 3, 4, and 5, the thing which carry out the trap of the particle and to do is possible, carrying out microscope observation by transmitted illumination.

[0055] (2) The cell maintenance and the matter injector of this invention concerning claim 6 In order to carry out the suction trap of the particles, such as a cell, to the opening edge for particle traps which does not hold a cell on the surface of a substrate like before, but is formed in the 1st set plate edge side, The end face 22 of the 1st substrate 11 with which the opening edge B for particle traps is formed Since it has structure which can be accessed freely from the outside and there is moreover no obstruction in the upper part While microscope observation using both transmitted illumination and incident light mold reflected illumination can be performed and the microscope observation by transmitted illumination is attained to particles, such as a cell, the micro-channel array side in which the hollow and the slot are formed can also carry out microscope observation using incident light mold reflected illumination. Therefore, it is possible to stab matter, such as DNA, certainty and more easily.

[0056] (3) Moreover, since the cell maintenance and the matter injector of this invention concerning claim 6 carry out the suction trap of the particles, such as a cell, to the opening edge for particle traps currently formed in the 1st set plate edge side and they can carry out near of the direction which the micropipette for a particle (cell) stab moves horizontally in case they pour matter, such as DNA, into a particle, observation for a high scale factor and actuation at the tip of a micropipette within the depth of focus are possible for them. Therefore, it is possible to perform impregnation of matter, such as DNA to a cell, observing the micropipette for a particle (cell) stab under a microscope. That is, since the direction (almost horizontal) and the observation direction (perpendicular direction) of a microscope from which a micropipette is moved intersect perpendicularly mostly in injecting matter, such as DNA, into a cell by the micropipette for a particle (cell) stab, a cell can be observed for a high scale factor, and a micropipette tip can be moved in the depth of focus of a microscope.

[0057] (4) Since the matter can be further poured in according to the cell maintenance and the matter injector of this invention concerning claim 6, observing under a microscope even if it is two or more cells which have big variation in a configuration, magnitude, and resiliency, the matter can be poured in certainly.

[0058] (5) Moreover, set to the micro-channel array equipment of this invention concerning claims 1 and 2, and the cell maintenance and the matter injector of this invention concerning claim 6. When the 1st substrate and the 2nd substrate are joined and stuck free [removal] mechanically Though inclusion, such as a cell fragment intermingled in a cell sample, was attracted, by removing and washing substrates after use and making it join and stick again, plugging can be removed easily and a reuse can be presented.

[0059] As mentioned above, according to this invention, in actual use of a microinjection method, the trap of a particle while observing a cell under a microscope, the stab of a needle, etc. are able to pour the matter into a particle (for example, cell) efficiently [it is easy and], and the effectiveness of a microinjection method can be raised remarkably. Therefore, since this invention can raise the effectiveness of a microinjection method sharply, it is useful in each field, such as medicine, biochemistry, and gene engineering.

[Translation done.]

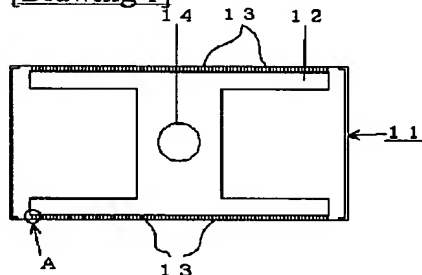
*** NOTICES ***

JPO and NCIPi are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

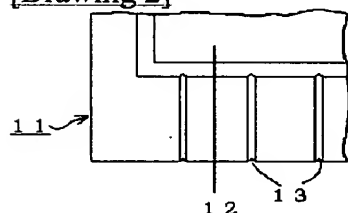
1. This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
2. **** shows the word which can not be translated.
3. In the drawings, any words are not translated.

DRAWINGS

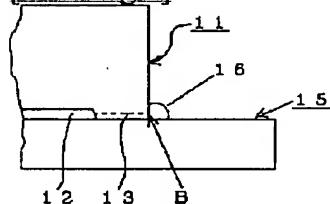
[Drawing 1]



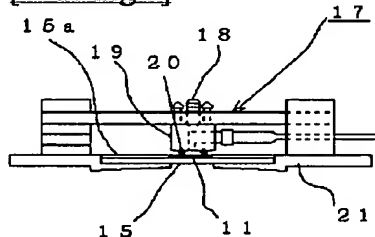
[Drawing 2]



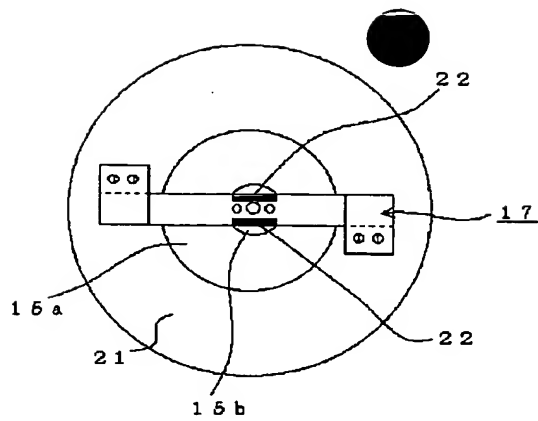
[Drawing 3]



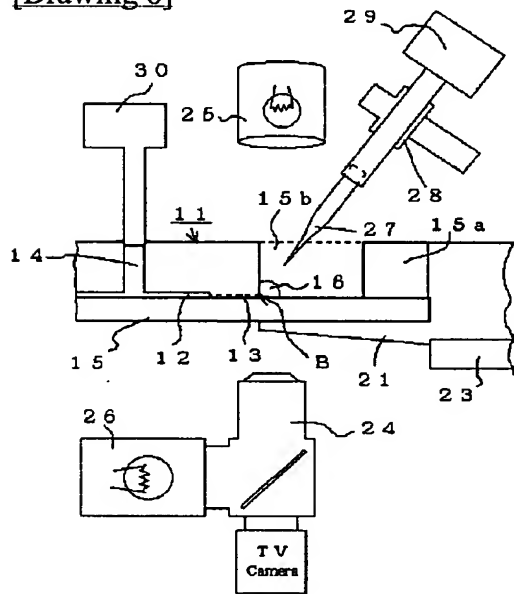
[Drawing 4]



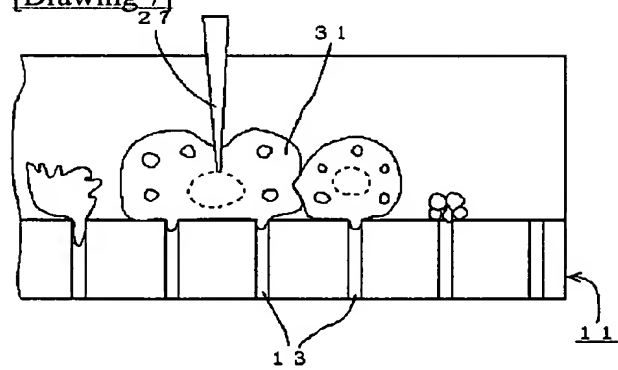
[Drawing 5]



[Drawing 6]



[Drawing 7]



[Translation done.]

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2002-27969

(P2002-27969A)

(43) 公開日 平成14年1月29日 (2002.1.29)

(51) Int.Cl.⁷

識別記号

F I

テマコード^{*} (参考)

C 1 2 M 1/00

C 1 2 M 1/00

A 4 B 0 2 4

C 1 2 N 15/09

C 1 2 N 15/00

A 4 B 0 2 9

審査請求 有 請求項の数 8 O L (全 9 頁)

(21) 出願番号 特願2000-212366(P2000-212366)

(22) 出願日 平成12年7月13日 (2000.7.13)

(71) 出願人 501145295

独立行政法人 食品総合研究所

茨城県つくば市観音台2丁目1番地12

(71) 出願人 597168413

菊池 佑二

茨城県竜ヶ崎市久保台4-1-10-2-506

(72) 発明者 菊池 佑二

茨城県竜ヶ崎市久保台4-1-10-2-506

(74) 代理人 100074077

弁理士 久保田 藤郎 (外1名)

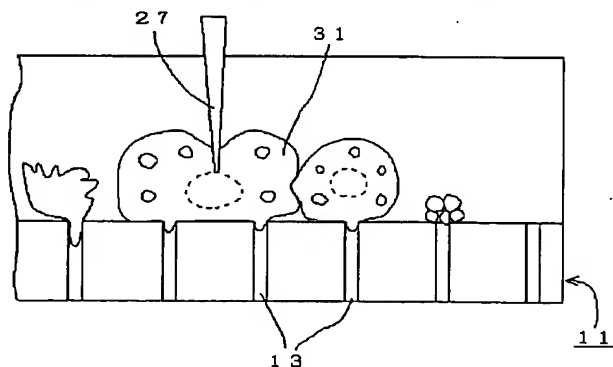
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 マイクロチャネルアレイ装置、粒子保持方法、細胞保持ならびに物質注入方法、及び細胞保持ならびに物質注入装置

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】 マイクロインジェクション法の実際の使用における種々の問題を解決し、顕微鏡で細胞を観察しながらの粒子のトラップや針の刺入などが容易であって、効率良く粒子（例えば、細胞）に物質を注入することのできる方法並びにこの方法の実施に好適な装置の提供。

【解決手段】 基板の表面に細胞をトラップするこれまでの方法に替えて、基板の端面（側面）に粒子トラップ用開口端を有するマイクロチャネルアレイ装置を用いて該開口端に細胞を吸入トラップすることにより、顕微鏡観察の方向とその焦点深度内でのマイクロピット27先端の移動を可能にし、それにより實際上効率良く物質の注入を行える。



【特許請求の範囲】

【請求項1】 基板を貫通する貫通孔を有する窪みと、該窪みと基板の端面の間を連通する多数の微細な溝とを該基板表面に有する第1基板と、透明な第2基板とからなり、前記第1基板の表面に前記第2基板を接合させることにより、前記第1基板と前記第2基板との接合部であって前記第1基板の端面に、前記溝によって形成される粒子トラップ用開口端が形成されていることを特徴とするマイクロチャネルアレイ装置。

【請求項2】 第1基板がシリコン基板であり、第2基板が透明なガラス基板である請求項1記載のマイクロチャネルアレイ装置。

【請求項3】 請求項1又は2記載のマイクロチャネルアレイ装置を用い、第1基板の貫通孔を通して引圧をかけ、それによって第1基板端面に形成されている粒子トラップ用開口端に粒子を吸引トラップすることを特徴とする粒子保持方法。

【請求項4】 吸引トラップされる粒子が、細胞である請求項3記載の粒子保持方法。

【請求項5】 第1基板端面に形成されている粒子トラップ用開口端の近傍を透過照明及び落射型反射照明の両方を用いて顕微鏡観察しながら、粒子を吸引トラップすることを特徴とする請求項4記載の粒子保持方法。

【請求項6】 請求項1又は2記載のマイクロチャネルアレイ装置、前記マイクロチャネルアレイ装置搭載用ステージ、透過照明と落射型照明のいずれか一方或いは両方を有する顕微鏡、マイクロピペット、前記マイクロピペットを操作するマイクロマニピュレータ、前記マイクロピペットから物質を押し出すための圧発生器、及び、吸引トラップ用引圧発生器からなることを特徴とする細胞保持ならびに物質注入装置。

【請求項7】 請求項6記載の細胞保持ならびに物質注入装置を用い、第1基板の貫通孔を通して引圧をかけ、それによって第1基板端面に形成されている粒子トラップ用開口端に細胞を吸引トラップし、次いで吸引トラップされた細胞に対して、マイクロピペットを刺入することにより、細胞内に物質を注入することを特徴とする細胞保持ならびに物質注入方法。

【請求項8】 第1基板端面に形成されている粒子トラップ用開口端の近傍を透過照明及び落射型反射照明の両方を用いて顕微鏡観察しながら、細胞を吸引トラップし、次いで吸引トラップされた細胞に対して、マイクロピペットを刺入することにより、細胞内に物質を注入する請求項7記載の細胞保持ならびに物質注入方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明は、マイクロチャネルアレイ装置、粒子保持方法、細胞保持ならびに物質注入方法、及び細胞保持ならびに物質注入装置に関し、詳しくは細胞に遺伝子等の物質を注入するのに最も好適なマ

イクロインジェクション法の効率化を図るためのマイクロチャネルアレイ装置、粒子保持方法、細胞保持ならびに物質注入方法、及び細胞保持ならびに物質注入装置に関するものである。

【0002】

【従来の技術】 細胞内に遺伝子を導入することのできる新技術の開発は、有用な特質を有する動植物種及び微生物種の育種効率を高める上で鍵となるものである。これまで種々の方法が開発されてきたが、確実性と効率性の両方を有する技術は未開発である。

【0003】 例えば、細胞保持用ガラスマイクロピペットと細胞刺入用ガラスマイクロピペットとを、マイクロマニピュレータを用いて操作し、細胞1個1個に遺伝子を注入するマイクロインジェクション法は最も確実な方法であるが、その操作に熟練と時間を要し、そのため処理能力が低いことが大きな欠点になっている。しかしながら、貴重な細胞と遺伝子を処理する場合、確実性がより重視されることから、マイクロインジェクション法は現在でも唯一の選択肢である。

【0004】 そこで、このマイクロインジェクション法の効率化に関して、これまで多くの技術開発努力が行なわれてきた。例えば、特開平1-112976号公報には、基板に貫通孔を規則的にあけ、そこに細胞をトラップして、基板の位置と注入針の位置をステップモーターとコンピューターにより自動的に制御することで注入を自動化する試みが記載されている。本発明者も、多数の注入針を規則的に配列したマイクロキャピラリーアレイを作製する技術を開発し、これに対応した位置にチャンバーを有するマイクロチャンバーアレイを用いて、マイクロチャンバーアレイに保持された全ての細胞へのDNAの一括注入を可能とすることにより、さらに効率化を進めた(特開2000-23657号公報)。

【0005】 しかしながら、上記のいずれの発明も、細胞の形状、大きさ、弾力性をほぼ均一と仮定して装置開発を行ったものである。実際には、それらがほぼ一定であることは極めて希であり、殆どの場合、細胞の形状、大きさ、弾力性はそれぞれに大きなバラツキがあるのが普通である。そのため、各細胞に対する注入針の位置操作を同一に行ったのでは、多くの細胞に対して針が刺さらないか、或いは、多くの細胞を破壊する結果になる。従って、殆どの場合、確実性の点から、トラップされた1個1個の細胞に対して、顕微鏡で観察しながら針を刺入していくことが求められている。

【0006】 このように、現時点では、確実性の点から、トラップされた1個1個の細胞に対して、顕微鏡で観察しながら針を刺入していくことが求められていることから、顕微鏡で観察しながらの細胞のトラップや針の刺入などをより効率化する技術が要望されている。

【0007】 ところで、上記いずれの発明も含めて、これまで開発されたマイクロインジェクション装置は、い

ずれも基板表面に規則的に貫通孔をあけて、その開口端に細胞を保持することを行っており、基板の表面に細胞を保持するように構成されている。

【0008】しかしながら、ガラス基板などの透明基板に微小な貫通孔をあけることは極めて難しいことから、実際には微小な貫通孔をあける基板としては、シリコン基板を用いざるを得ない。その場合、シリコン基板は可視光を透過しないため、落射型反射照明方式で細胞を観察しなければならなくなる。しかも、貫通孔部では光が反射されず、若しくは乱反射されて、その直上にある部分は暗部となって観察が困難になる。さらに、針の動く方向と顕微鏡観察方向がほぼ同じであるため、実際に顕微鏡観察を行うことは極めて難しく、特に、作業距離が短くなる高倍率での観察は実際上不可能である。また、仮に顕微鏡観察できたとしても、針が顕微鏡の焦点深度の方向で動くため、動きと共に像がぼけて、その位置操作は極めて難しくなる。

【0009】従って、基板の表面に細胞を保持するように構成されているこれまでのマイクロインジェクション装置では、確実性の点から求められている顕微鏡で細胞を観察しながらの針刺入を行うことは、殆ど不可能である。

【0010】以上のような数々の問題点があったため、上記のマイクロインジェクション法において、顕微鏡で観察しながら細胞のトラップや針の刺入などをより効率化する技術は、その実用化が進んでいないのが現状である。

【0011】

【発明が解決しようとする課題】本発明は、マイクロインジェクション法の実際の使用における種々の問題を解決し、顕微鏡で細胞を観察しながらの粒子のトラップや針の刺入などが容易であって、効率良く粒子（例えば、細胞）に物質を注入することのできる方法ならびにこの方法の実施に好適な装置の提供を目的とするものである。

【0012】

【課題を解決するための手段】本発明者は、上記課題を解決すべく鋭意検討を重ねた結果、マイクロインジェクション法の実施にあたり、基板表面に多数の貫通孔をあけてその開口端に細胞をトラップする方法、即ち、基板の表面に細胞をトラップするこれまでの方法に替えて、基板の端面（側面）に粒子トラップ用開口端を有するマイクロチャンネルアレイ装置を用いて該開口端に細胞を吸入トラップすることにより、顕微鏡観察の方向とその焦点深度内でのマイクロピペット先端の移動を可能にし、それにより実際上効率良く物質の注入を行えることを見出し、この知見に基いて本発明を完成するに至った。

【0013】本発明者は、これまでシリコン基板に加工した微細な溝のアレイをガラス基板で覆うことによりマイクロチャンネルアレイを作成する方法を考案し、その血

液成分測定への応用（特開平2-130471号公報、特許第2532707号公報）、粒子の濾過、分級への応用（特開平11-165062号公報）等を開発してきたが、マイクロチャンネルアレイのマイクロインジェクション法への利用、第1基板と第2基板の密着部のマイクロチャンネル開口端を利用して第1基板端面に粒子を保持するマイクロチャンネルアレイ装置等は、本発明者が今回初めて発明したものである。

【0014】即ち、請求項1に係る本発明は、基板を貫通する貫通孔を有する窪みと、該窪みと基板の端面の間を連通する多数の微細な溝とを該基板表面に有する第1基板と、透明な第2基板とからなり、前記第1基板の表面に前記第2基板を接合させることにより、前記第1基板と前記第2基板との接合部であって前記第1基板の端面に、前記溝によって形成される粒子トラップ用開口端が形成されていることを特徴とするマイクロチャンネルアレイ装置を提供するものである。

【0015】請求項2に係る本発明は、第1基板がシリコン基板であり、第2基板が透明なガラス基板である請求項1記載のマイクロチャンネルアレイ装置を提供するものである。

【0016】請求項3に係る本発明は、請求項1又は2記載のマイクロチャンネルアレイ装置を用い、第1基板の貫通孔を通して引圧をかけ、それによって第1基板端面に形成されている粒子トラップ用開口端に粒子を吸引トラップすることを特徴とする粒子保持方法を提供するものである。

【0017】請求項4に係る本発明は、吸引トラップされる粒子が、細胞である請求項3記載の粒子保持方法を提供するものである。

【0018】請求項5に係る本発明は、第1基板端面に形成されている粒子トラップ用開口端の近傍を透過照明及び落射型反射照明の両方を用いて顕微鏡観察しながら、粒子を吸引トラップすることを特徴とする請求項4記載の粒子保持方法を提供するものである。

【0019】請求項6に係る本発明は、請求項1又は2記載のマイクロチャンネルアレイ装置、前記マイクロチャンネルアレイ装置搭載用ステージ、透過照明と落射型照明のいずれか一方或いは両方を有する顕微鏡、マイクロピペット、前記マイクロピペットを操作するマイクロマニピュレータ、前記マイクロピペットから物質を押し出すための圧発生器、及び、吸引トラップ用引圧発生器からなることを特徴とする細胞保持ならびに物質注入装置を提供するものである。

【0020】請求項7に係る本発明は、請求項6記載の細胞保持ならびに物質注入装置を用い、第1基板の貫通孔を通して引圧をかけ、それによって第1基板端面に形成されている粒子トラップ用開口端に細胞を吸引トラップし、次いで吸引トラップされた細胞に対して、マイクロピペットを刺入することにより、細胞内に物質を注入

することを特徴とする細胞保持ならびに物質注入方法を提供するものである。

【0021】請求項8に係る本発明は、第1基板端面に形成されている粒子トラップ用開口端の近傍を透過照明及び落射型反射照明の両方を用いて顕微鏡観察しながら、細胞を吸引トラップし、次いで吸引トラップされた細胞に対して、マイクロピペットを刺入することにより、細胞内に物質を注入する請求項7記載の細胞保持ならびに物質注入方法を提供するものである。

【0022】

【発明の実施の形態】以下に、本発明の実施の形態を示す。まず請求項1に係る本発明は、マイクロチャネルアレイ装置に関し、基板を貫通する孔を有する窪みと、該窪みと基板の端面の間を連通する多数の微細な溝とを該基板表面に有する第1基板と、透明な第2基板とからなり、前記第1基板の表面に前記第2基板を接合させることにより、前記第1基板と前記第2基板との接合部であって前記第1基板の端面に、前記溝によって形成される粒子トラップ用開口端が形成されていることを特徴とするものである。このような請求項1に係る本発明のマイクロチャネルアレイ装置について、図面を参照しつつ説明する。図1は、第1基板11の1例を示す正面図であり、第1基板11上に存在する窪みと溝のデザインの1例が示されている。図2は、図1のA部を拡大した説明図である。図3は、第1基板11と、透明な第2基板15とからなる、請求項1に係る本発明のマイクロチャネルアレイ装置の側面を一部拡大した図であって、細胞をトラップしている状態を示す説明図である。

【0023】請求項1に係る本発明のマイクロチャネルアレイ装置は、下記に示すような第1基板11と第2基板15とを接合、密着させることにより得られる。第1基板11は、平面形状が略長方形をなす、薄板状のものであって、特に請求項2に記載したように、シリコン基板からなるものである。この第1基板11の表面には、該基板を貫通する孔14を有する窪み12と、該窪み12と基板の端面の間を連通する多数の微細な溝13とが設けられている。図1、図2中、窪み12の端とそれに平行する第1基板11の端をつなぐ多数の短い線分のそれぞれが溝13を示している。ここで窪み12の平面形状は、図1では略「エ」字状とされているが、これに限定されるものではなく、例えば第1基板11の略全体をカバーする略長方形をなすものとしてもよい。また、図1に示す第1基板11は、図2、図3では、周縁部にテーパ（勾配）を付けたものとされているが、このテーパはなくとも差し支えない。

【0024】第1基板11には、さらに基板の表裏面を貫通する貫通孔14が窪み12の中に設けられている。図1では、貫通孔14として、平面形状が円形のものが示されているが、これに限定されるものではなく、該貫通孔14を通して引圧をかけられるものであれば、平面

形状が角形のものなどであっても差し支えない。また、図1では、貫通孔14は、第1基板11の中央部に設けられているが、1例を示したものであって、これに限定されるものでないことは、言うまでもない。

【0025】さらに、第1基板11には、窪み12と基板の端面の間を連通する多数の微細な溝13が設けられている。即ち、第1基板11には、図1、図2に示すように、窪み12の周囲の基板表面に、窪み12の端とそれに平行する第1基板11の端面の間を連通する（つなぐ）微細な溝13が、基板の端面に沿って（図1では上下の端面に沿って）多数設けられている。このように、窪み12の端とそれに平行する基板の端面の間を、多数の微細な溝13が連通するようになっている。

【0026】このような第1基板11は、例えばフォトリソグラフィとエッチングの技法を用いて、以下のようウエーハー（シリコン単結晶からなる基板用薄板）を加工することにより得ることができる。まず、1回目のフォトリソグラフィとエッチングで、溝13を加工し、次に2回目のフォトリソグラフィとエッチングで窪み12を加工する。さらに、貫通孔14をサンドブラスト法等で加工し、最後にウエーハーをカットすることにより、第1基板（チップ）11を作製することができる。

【0027】ウエーハーのカットには、端面がきれいに仕上がることから、高密度プラズマによる異方性エッチングを用いることが望ましい。ここで高密度プラズマによる異方性エッチングとは、基板表面に塗布したフォトレジストにフォトリソグラフィ工程によってカット部分を形成し、そのフォトレジストをマスクとして反応性イオンの高密度プラズマによるエッチングでカットする技術である。この他に、ダイシングカットでも、端の欠けが最小限になるように注意して行うことで、実用に耐える端面を得ることができる。また、ある深さまでエッチングで彫り、それから残りをダイシングカットしても良い。

【0028】このような第1基板11の大きさは特に限定されないが、粒子、特に細胞のトラップに用いられることから、通常、縦8～12mm、横16～24mm、厚さ0.4～0.6mm程度のものであって、溝13の幅が0.002～0.02mm、長さが0.05～0.2mm程度のものである。

【0029】次に、上記第1基板11と接合、密着させられる第2基板15は、透明な基板であって、請求項2に記載したように、通常は、透明なガラス基板からなるものである。従って、第1基板と第2基板とは、請求項2に記載したように、それぞれシリコン単結晶からなるシリコン基板と、透明なガラスからなる透明なガラス基板とであることが好ましい。この第2基板15は、通常、上記第1基板11と略同様の平面形状を有するものであって、第1基板11より大きいものとする、図3

に示されるように、第1基板11の端面と第2基板15の表面とで形成されるコーナー部に、粒子(細胞)16を確実に保持することができる。第1基板11より大きければ、第2基板15は勿論円盤形状であってもよい。

【0030】請求項1に係る本発明のマイクロチャネルアレイ装置は、上記第1基板11の表面に、即ち窪み12や溝13などが設けられている側に、上記第2基板15を接合、密着させたものである。上記第1基板11の表面に上記第2基板15を接合、密着させることにより、第1基板11と第2基板15との接合部であって第1基板11の端面に、溝13によって形成される粒子トラップ用開口端Bがいわば自動的に形成される。この粒子トラップ用開口端Bに粒子(細胞)16をトラップ(捕捉)する。

【0031】上記したように、平面形状が第1基板11より大きい第2基板15を用いると、図3に示されるように、粒子トラップ用開口端B付近に、第1基板11の端面と第2基板15の表面とでコーナー部が形成され、このコーナー部に、粒子(細胞)16を確実に保持することができる。

【0032】第1基板11の表面に上記第2基板15を接合、密着させる方法としては、例えば陽極接合法を用いることもできるが、好ましくは必要に応じて取り外し可能とするため、ホルダー等を用いて機械的に両者を圧着させるとよい。

【0033】図4、図5に、第1基板11の表面に上記第2基板15を、ホルダーを用いて機械的に接合、密着させた状態を示す。図4は、その正面図であり、図5はその平面図である。この図4、図5は、第2基板15として、円盤状のガラス基板を用いた例である。図中、符号17はホルダーを示しており、押しネジ18、樹脂ブロック19、リング20、載置台21などから構成されている。このようなホルダー17の押しネジ18で樹脂ブロック19を押すことにより、リング20を介して、第1基板11が第2基板15に押しつけられ、接合、密着させられる。通常、第2基板15上にセンターガイド用基板15aを載せ、該センターガイド用基板15aの中央に第1基板11が丁度入る大きさの円形の孔を開けておく。そうすることで、第1基板11を第2基板15の中央に容易に置くことができる。該センターガイド用基板15aは、プラスチック基板でよい。この場合、第1基板11の元の表面(溝13、窪み12以外の部分であって、第2基板15と密着する部分)を光学研磨しておくと共に、第2基板15の表面も光学研磨されたものを用いることにより、両者の密着度を十分に高くし、漏れを防ぐことができる。

【0034】一般に、細胞試料を調製するとき、一部の細胞が壊れ、その断片等が混在することが一般的である。また、その混在物を取り除けない場合が多い。そのため、第1基板11端面の開口部Bに粒子(細胞)16

を吸引トラップするときにも、混在物が吸引されることがあり、しばしばマイクロチャネルを構成している一部の溝13が詰まる結果になる。上記の如く、図4、図5に示すように、第1基板11と第2基板15とを機械的に圧着させた場合には、使用後、これら基板を取り外して洗浄し、再度両者を圧着させることにより、容易に詰まりを取り除くことができ、従って再使用が可能となる。一方、溶着により接着させた場合には、詰まりを取り除くことは困難であり、再使用が難しくなる。

【0035】請求項1に係る本発明のマイクロチャネルアレイ装置は、このように第1基板11の表面に第2基板15を接合、密着させることにより、第1基板11と第2基板15との接合部であって第1基板11の端面に、溝13によって形成される粒子トラップ用開口端Bが形成されており、この粒子トラップ用開口端Bに粒子(細胞など)16をトラップ(捕捉)する。図5に示したように、粒子トラップ用開口端Bが形成されている第1基板11の端面22は、外部から自由にアクセスできる構造になっており、また、その上部には障害物がないようになっているので、透過照明での顕微鏡観察が可能となっている。

【0036】このような請求項1又は2に係る本発明のマイクロチャネルアレイ装置を用いた粒子保持方法を提供するのが、請求項3に係る本発明である。請求項3に係る本発明は粒子保持方法に関し、請求項1又は2記載のマイクロチャネルアレイ装置を用い、第1基板の貫通孔を通して引圧をかけ、それによって第1基板端面に形成されている粒子トラップ用開口端に粒子を吸引トラップすることを特徴とするものである。なお、後述する図6は、請求項6に係る本発明の細胞保持ならびに物質注入装置の1例を用いて、細胞保持ならびに物質注入を行っている模様を示す説明図であるが、粒子16を吸引トラップするところまでの装置は、この請求項3に係る本発明の方法でも利用されるものであるので、適宜、これを参照して説明することとする。

【0037】請求項3に係る本発明では、請求項1又は2記載のマイクロチャネルアレイ装置を用いる。これについては、上記した通りである。請求項3に係る本発明では、このような請求項1又は2記載のマイクロチャネルアレイ装置を用い、第1基板11の貫通孔14を通して引圧をかけ、それによって第1基板11端面に形成されている粒子トラップ用開口端Bに粒子16を吸引トラップする。

【0038】例えば、まず初めに、粒子トラップ用開口端B付近であって、第1基板11の端面と第2基板15の表面とで形成されるコーナー部近傍に、粒子(細胞など)16を置いて、粒子16を粒子トラップ用開口端Bに吸引トラップする準備をする。なお、粒子16をコーナー部近傍に置く手段は、特に限定されないが、先端径が大きいマイクロピペットとそれを操作するためのマイ

クロマニピュレータを別に用意し、そのマイクロピペット内に粒子浮遊液を予め入れておき、マイクロマニピュレータでマイクロピペット先端位置をコーナー部近傍に持っていき、粒子浮遊液をマイクロピペットより押出せばよい。粒子を粒子トラップ用開口端Bにさらに近付けるには、請求項6に係る本発明において示すような粒子（細胞）刺入用のマイクロピペット27をマイクロマニピュレータ28を用いてマイクロピペット先端で粒子を押す等の操作をすればよい。しかし、吸引すれば周りの液体と共に粒子が動いて開口端に来るので、一般にその操作は不要である。その際、センターガイド用基板15aの中央に開けられている孔は液溜め15bになる。次に、第1基板11に設けられている貫通孔14を通じて、例えば別途設置した細胞などの粒子16を吸引トラップするための引圧を発生させる、吸引トラップ用引圧発生器30などを用いて、引圧をかける。すると、第1基板11に設けられている窪み12を経由して、粒子トラップ用開口端Bにも引圧がかかり、粒子16は前記コーナー部近傍から粒子トラップ用開口端Bに吸引トラップされ、そのまま保持される。

【0039】なお、吸引トラップの対象となる粒子としては、例えば請求項4に記載したように、マイクロインジェクション法において、DNA等の物質が注入される対象となる細胞などが挙げられる。

【0040】ここで、請求項5に記載したように、第1基板11の端面に形成されている粒子トラップ用開口端Bの近傍を、透過照明及び落射型反射照明の両方を用いて顕微鏡観察しながら、粒子16を吸引トラップすると、粒子16に対して透過照明による顕微鏡観察が可能となり、同時に、落射型反射照明を用いて、窪み12や溝13が形成されている、マイクロチャネルアレイ側も同時に顕微鏡観察することができる。従って、より確実に細胞などの粒子16を保持することができる。

【0041】次に、請求項6に係る本発明は細胞保持ならびに物質注入装置に関し、請求項1又は2記載のマイクロチャネルアレイ装置、前記マイクロチャネルアレイ装置搭載用ステージ、透過照明と落射型照明のいずれか一方或いは両方を有する顕微鏡、マイクロピペット、前記マイクロピペットを操作するマイクロマニピュレータ、前記マイクロピペットから物質を押し出すための圧発生器、及び、吸引トラップ用引圧発生器からなることを特徴とするものである。

【0042】図6は、請求項6に係る本発明の細胞保持ならびに物質注入装置の1例を用いて、細胞保持ならびに物質注入を行っている模様を示す説明図である。請求項6に係る本発明の細胞保持ならびに物質注入装置は、請求項1又は2記載のマイクロチャネルアレイ装置を有している。このようなマイクロチャネルアレイ装置は、前記したように、基板を貫通する貫通孔14を有する窪み12と、該窪み12と基板の端面の間を連通する多数

の微細な溝13とを該基板表面に有する第1基板と、この第1基板の表面に接合される透明な第2基板15とからなり、前記第1基板11の表面に前記第2基板15を接合させることにより、第1基板11と第2基板15との接合部であって第1基板11の端面に、溝13によって形成される粒子トラップ用開口端Bが形成されているものである。この粒子トラップ用開口端Bに粒子（細胞）16をトラップ（捕捉）する。

【0043】請求項6に係る本発明の細胞保持ならびに物質注入装置は、請求項1又は2記載のマイクロチャネルアレイ装置の他に、まず前記マイクロチャネルアレイ装置搭載用ステージ23を有している。このマイクロチャネルアレイ装置搭載用ステージ23としては、マイクロチャネルアレイ装置を搭載しうるものであればよく、特に制限されない。

【0044】請求項6に係る本発明の細胞保持ならびに物質注入装置は、次に透過照明と落射型照明のいずれか一方或いは両方を有する顕微鏡24を有している。図6中、符号25は透過照明用の光源を示しており、符号26は落射型照明用の光源を示している。これらは、既知のものを用いることができる。

【0045】請求項6に係る本発明の細胞保持ならびに物質注入装置は、さらに粒子（細胞）刺入用のマイクロピペット27、前記マイクロピペットを操作するマイクロマニピュレータ28、前記マイクロピペット27から物質を押し出すための圧発生器29、及び、吸引トラップ用引圧発生器30とを有している。これらについても、既知のものを用いることができる。さらに、図4、図5に示すようなホルダー17を用いて、第1基板11と第2基板15とを機械的に密着させることがより好ましい。

【0046】このような請求項6に係る本発明の細胞保持ならびに物質注入装置によれば、顕微鏡で細胞を観察しながらの粒子のトラップや針の刺入などが容易であって、効率良く粒子（例えば、細胞）に物質を注入することができる。請求項6に係る本発明の細胞保持ならびに物質注入装置を用いた、そのような効率のよい細胞保持ならびに物質注入方法を提供するのが、請求項7と請求項8に係る本発明である。

【0047】即ち、請求項7に係る本発明は細胞保持ならびに物質注入方法に関し、請求項6記載の細胞保持ならびに物質注入装置を用い、第1基板の貫通孔を通して引圧をかけ、それによって第1基板端面に形成されている粒子トラップ用開口端に細胞を吸引トラップし、次いで吸引トラップされた細胞に対して、マイクロピペットを刺入することにより、細胞内に物質を注入することを特徴とするものである。

【0048】請求項7に係る本発明において、粒子トラップ用開口端に細胞を吸引トラップするところまでは、請求項3、4に係る本発明と同様である。即ち、まず初

めに、粒子トラップ用開口端B付近であって、第1基板11の端面と第2基板15の表面とで形成されるコーナ一部近傍に、細胞などの粒子16を置いて、細胞などの粒子16を粒子トラップ用開口端Bに吸引トラップする準備をする。なお、この操作は、細胞などの粒子浮遊液をコーナ一部近傍に注げば充分である。次に、第1基板11に設けられている貫通孔14を通じて、吸引トラップ用引圧発生器30から引圧をかける。すると、第1基板11に設けられている窪み12を経由して、粒子トラップ用開口端Bにも引圧がかかり、細胞などの粒子16は前記コーナ一部近傍から粒子トラップ用開口端Bに吸引トラップされ、そのまま保持される。

【0049】このように吸引トラップされた細胞などの粒子16に対して、粒子（細胞）刺入用のマイクロピペット27を刺入することにより、細胞内に物質を注入する。

【0050】細胞内に物質を注入するにあたっては、透過照明用の光源25などを用いることにより、細胞などの粒子16に対して透過照明による顕微鏡観察が可能となる。このため、透過照明により第1基板11の端面に形成されている粒子トラップ用開口端Bの近傍を顕微鏡24で観察しながら、粒子（細胞）刺入用のマイクロピペット27により容易にDNA等の物質を刺入することが可能である。

【0051】さらに、請求項8に記載したように、透過照明用の光源25と共に、落射型反射照明用の光源26を用いることにより、透過照明及び落射型反射照明の両方を用いての顕微鏡観察ができ、細胞などの粒子16に対して透過照明による顕微鏡観察が可能となると同時に、落射型反射照明を用いて、窪み12や溝13が形成されている、マイクロチャネルアレイ側も顕微鏡観察することができる。従って、より確実、かつより容易にDNA等の物質を刺入することが可能である。

【0052】なお、図6では、粒子（細胞）刺入用のマイクロピペット27は、第2基板15に対し約45度の傾きで描かれているが、これに限定されるものではなく、本発明では、細胞等の粒子が第1基板11と第2基板15との接合部であって第1基板11の端面に形成された粒子トラップ用開口端Bにトラップされるため、水平に近い角度まで持ってきた状態での操作も可能である。このようにすることにより、粒子（細胞）刺入用のマイクロピペット27を動かす方向（水平方向）と顕微鏡24の観察方向（垂直方向）とがほぼ直交することとなる。従って、高倍率で観察することができ、かつ、粒子（細胞）刺入用のマイクロピペット27の先端をほぼ顕微鏡24の焦点深度内で動かすことができ、位置操作をより容易に行うことができる。

【0053】なお、上記した如き請求項6に係る本発明の細胞保持ならびに物質注入装置を用いてポプラプラス

（針）を刺したところの顕微鏡画像からの参考図を図7に示す。ポプラプラス31の大きさ、形状、弾力性等は極めて不均一であり、またプロトプラス浮遊液調製試料は膜破片や葉緑体等の不純物をも含む。このような不揃いな粒子を対象としてマイクロインジェクションを行う場合には、顕微鏡で観察しながら注入操作を効率良く行うことができる本発明が不可欠である。

【0054】

【発明の効果】本発明は、以上説明したように構成されるので、以下に記載するような効果を有する。

（1）請求項1、2に係る本発明のマイクロチャネルアレイ装置は、従来のように基板の表面に細胞を保持するのではなく、第1基板端面に形成されている粒子トラップ用開口端に細胞等の粒子を吸引トラップするため、粒子トラップ用開口端Bが形成されている第1基板11の端面22は、外部から自由にアクセスできる構造になっており、しかも、その上部には障害物がないようになっているので、透過照明での顕微鏡観察が可能である。請求項3、4、5に係る本発明の粒子保持方法によれば、透過照明で顕微鏡観察しながら粒子をトラップすることが可能である。

【0055】（2）請求項6に係る本発明の細胞保持ならびに物質注入装置は、従来のように基板の表面に細胞を保持するのではなく、第1基板端面に形成されている粒子トラップ用開口端に細胞等の粒子を吸引トラップするため、粒子トラップ用開口端Bが形成されている第1基板11の端面22は、外部から自由にアクセスできる構造になっており、しかも、その上部には障害物がないようになっているので、透過照明及び落射型反射照明の両方を用いての顕微鏡観察ができ、細胞などの粒子に対して透過照明による顕微鏡観察が可能となると同時に、落射型反射照明を用いて、窪みや溝が形成されている、マイクロチャネルアレイ側も顕微鏡観察することができる。従って、より確実、かつより容易にDNA等の物質を刺入することが可能である。

【0056】（3）また、請求項6に係る本発明の細胞保持ならびに物質注入装置は、第1基板端面に形成されている粒子トラップ用開口端に細胞等の粒子を吸引トラップするため、粒子にDNA等の物質を注入する際、粒子（細胞）刺入用のマイクロピペットの動く方向を水平に近くすることができることから、高倍率での観察と焦点深度内でのマイクロピペット先端の操作が可能である。従って、細胞へのDNA等の物質の注入を、粒子（細胞）刺入用のマイクロピペットを顕微鏡で観察しながら行うことが可能である。即ち、細胞に粒子（細胞）刺入用のマイクロピペットでDNA等の物質を注入するにあたり、マイクロピペットを動かす方向（ほぼ水平方向）と顕微鏡の観察方向（垂直方向）とがほぼ直交するので、細胞を高倍率で観察することができ、また、マイクロピペット先端を顕微鏡の焦点深度の中で動かすこと

ができる。

【0057】(4)さらに、請求項6に係る本発明の細胞保持ならびに物質注入装置によれば、形状、大きさ、弾力性に大きなバラツキのある複数の細胞であっても、顕微鏡で観察しながら物質の注入を行えるので、確実に物質を注入することができる。

【0058】(5)また、請求項1、2に係る本発明のマイクロチャネルアレイ装置と、請求項6に係る本発明の細胞保持ならびに物質注入装置とにおいて、第1基板と第2基板とを機械的に取り外し自在に接合、密着させた場合には、細胞試料に混在する細胞断片等の混在物が吸引されてたとしても、使用後、基板同士を取り外して洗浄し、再度接合、密着させることにより、容易に詰まりを取り除き、再使用に供することができる。

【0059】以上のように、本発明によれば、マイクロインジェクション法の実際の使用において、顕微鏡で細胞を観察しながらの粒子のトラップや針の刺入などが容易であって、効率良く粒子(例えば、細胞)に物質を注入することが可能であり、マイクロインジェクション法の効率を著しく高めることができる。従って、本発明は、マイクロインジェクション法の効率を大幅に高めることができるので、医学、生化学、遺伝子工学等の各分野で有用である。

【図面の簡単な説明】

【図1】 第1基板の1例を示す正面図である。

【図2】 図1のA部を拡大した説明図である。

【図3】 第1基板と、透明な第2基板とからなる、請求項1に係る本発明のマイクロチャネルアレイ装置の側面を一部拡大した図であって、細胞をトラップしている状態を示す説明図である。

【図4】 第1基板の表面に第2基板を、ホルダーを用いて機械的に接合、密着させた状態を示す正面図である。

【図5】 図4の平面図である。

【図6】 請求項6に係る本発明の細胞保持ならびに物

質注入装置の1例を用いて、細胞保持ならびに物質注入を行っている模様を示す説明図である。

【図7】 請求項6に係る本発明の細胞保持ならびに物質注入装置を用いてポプラプラストを吸引トラップし、細胞刺入用のマイクロピペット(針)を刺したところの顕微鏡画像からの参考図である。

【符号の説明】

11 第1基板(シリコン基板)

12 窪み

13 溝

14 貫通孔

15 第2基板(ガラス基板)

15a センターガイド用基板

15b 液溜め

16 粒子(細胞)

17 ホルダー

18 押しネジ

19 樹脂ブロック

20 Oリング

21 載置台

22 粒子トラップ用開口端Bが形成されている第1基板の端面

23 マイクロチャネルアレイ装置搭載用ステージ

24 顕微鏡

25 透過照明用の光源

26 落射型照明用の光源

27 粒子(細胞)刺入用のマイクロピペット

28 マイクロピペットを操作するマイクロコンピュータ

30 29 マイクロコンピュータから物質を押し出すための圧発生器

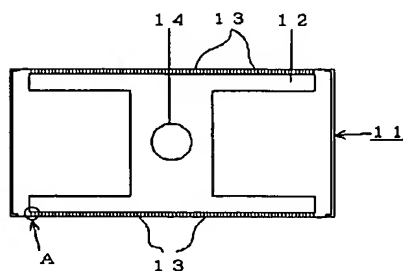
30 吸引トラップ用引圧発生器

31 ポプラプロトプラスト

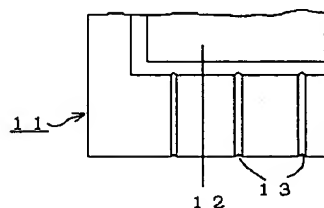
A 拡大されて図2として示されている部分

B 粒子トラップ用開口端

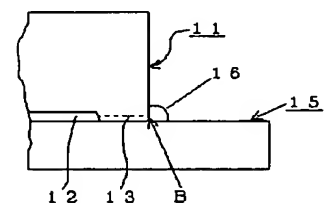
【図1】



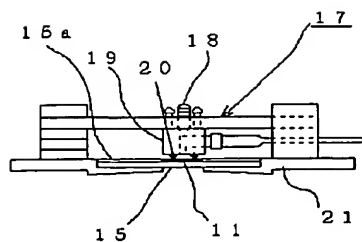
【図2】



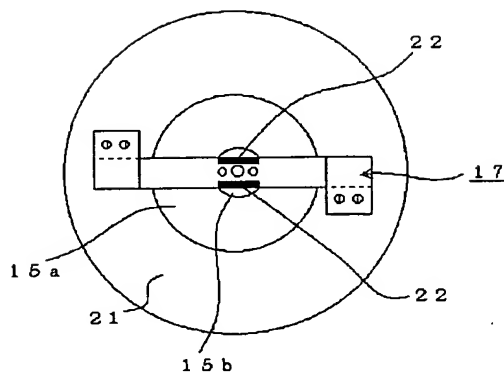
【図3】



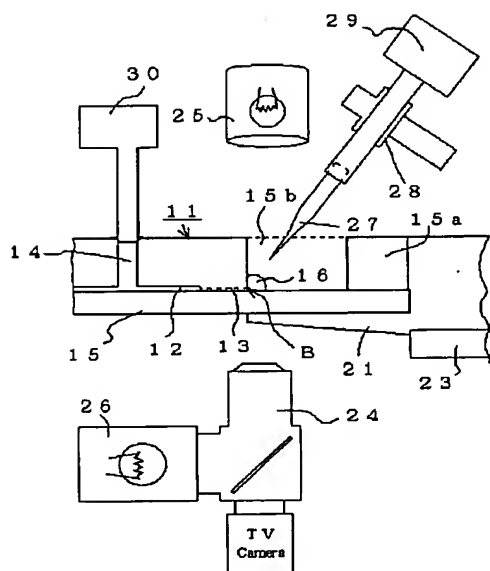
【図4】



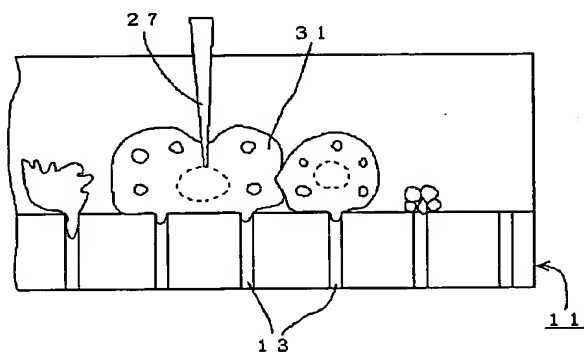
【図5】



【図6】



【図7】



フロントページの続き

Fターム(参考) 4B024 AA19 CA01 CA11 CA20 DA01
DA02 GA12 GA30 HA20
4B029 AA23 AA25 BB01 BB11 BB12
CC03 CC08